

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Zingiber zerumbet* (L.) Smith SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR E RENAL EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

Zinalton Gomes de ANDRADE¹
José Wilson do Nascimento CORRÊA²
Carlos Cleomir de Souza PINHEIRO³

¹Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;
²Colaborador UFAM; ³Orientador INPA

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais de origem vegetal oferecem grandes possibilidades para a produção de fármacos em razão da ampla diversidade química de componentes neles encontrados. A investigação desse campo representa a chance de desenvolvimento de novos tratamentos para doenças crônico-degenerativas com elevada prevalência na população mundial. A família de plantas Zingiberaceae, de distribuição geográfica Pantropical, está incluída na ordem Zingiberales e compreende cerca de 8 famílias e 100 gêneros. É representada nos trópicos e neotrópicos pelo gênero *Zingiber*, composto por 156 espécies (Pinheiro 2005). Em 2002, Thomson e colaboradores observaram que o tratamento de ratos Sprague-Dawley com o extrato aquoso da raiz do gengibre (*Zingiber officinale*) (500mg/Kg/dia por VO ou IP) por 4 semanas reduziu a concentração de prostaglandina E2 (PGE2) detectada no soro desses animais. O mecanismo anti-inflamatório por inibição da síntese de prostaglandinas havia sido anteriormente demonstrado por Flynn *et al.* (1968). Posteriormente foi observada também sua capacidade em inibir a produção de citocinas inflamatórias (Grzanna *et al.* 2004). Dentre as substâncias isoladas do gengibre observou-se que a molécula [6]-gingerol possuía potente atividade antioxidante tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Kim *et al.* 2007). O conjunto de ações antiinflamatórias e antioxidantes pode ser de grande importância para o combate à hipertensão, já que nesta condição há aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs) e de mediadores inflamatórios. A atividade antioxidante poderia promover redução de EROs, substâncias envolvidas na inativação do óxido nítrico, um importante vasodilatador endógeno gerado pelo endotélio vascular (Vasconcelos *et al.* 2007). Em 2002, Matos descreveu a planta *Alpinia speciosa* Schum, pertencente à mesma família do gengibre e popularmente conhecida como colônia ou jardineira que posteriormente foi estudada por Albuquerque e Neves em 2004. Estes últimos autores observaram que o extrato bruto das folhas de *Alpinia speciosa* apresentava ações diuréticas e hipotensoras, resultantes do antagonismo de canais de cálcio. Por fim, várias peças de evidência, principalmente a partir de estudos com ratos, sugerem que o gengibre (*Z. officinale*) exerce muitos efeitos diretos e indiretos sobre a pressão arterial e frequência cardíaca (Afzal *et al.* 2001). Em 2005, Ghayur e Gilani relataram que o extrato bruto de gengibre induziu queda dose-dependente (0,3-3mg/Kg) na pressão arterial média de ratos anestesiados. No entanto, os mecanismos pelos quais esse processo ocorre ainda não estão bem definidos. Também permanecem desconhecidos os mecanismos pelos quais o *Z. zerumbet* e espécies da mesma família produzem redução da pressão arterial e, principalmente, seu efeito sobre a pressão arterial no modelo de hipertensão arterial experimental que pretendemos investigar neste projeto. Nossa hipótese é de que o tratamento com *Zingiber zerumbet* promova benefícios adicionais no controle da hipertensão arterial e suas complicações, tais como redução do remodelamento cardiovascular, aumento na liberação de fatores

vasodilatadores presentes no endotélio vascular e renoproteção, com redução de proteinúria e melhora no controle do balanço hidroeletrólítico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do *Zingiber zerumbet* (L.) Smith

Para este estudo foram utilizados os rizomas de *Zingiber zerumbet*. Os mesmos foram coletados em área rural de Manaus-Amazonas em dezembro de 2014 no município de Iranduba/AM, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro (INPA). A excisada do material encontra-se depositada no herbário do INPA sob o registro nº186913, catalogada pelo Prof. Dr. Paul Maas (*Department of Plant Ecology and Evolutionary Biology*) herbarium University of Utrecht.

Higienização, Trituração, Secagem

Os rizomas foram higienizados e descascados em água corrente em descascador de batatas industrial (DB-06-N Siemens®). Em seguida foi realizada trituração em processador de alimentos (Philips Walita® RI1861) e liquidificador (walita® RI2048). O triturado resultante foi espalhado em bancada de mármore forrada com papel jornal para secagem em ambiente com ar condicionado na temperatura de 17 a 19 °C por 48h.

Percentual de Umidade

Para análise do percentual de umidade, logo após a trituração, foram pesados 10 frascos de vidro com 1g de rizoma *Z. zerumbet* úmido triturado em balança analítica (Bel Engineering®), acondicionados em bandeja metálica e colocados em estufa de circulação forçada (Blue M®) por 72 hs, em temperatura constante de 65 °C, após esse período os recipientes foram retirados da estufa e postos em um dessecador por 1h; em seguida o material vegetal foi novamente pesado obtendo-se o percentual de umidade (Pinheiro 2005).

Técnicas utilizadas no preparo do extrato hidro-alcoólico de *Zingiber zerumbet*

Para obtenção do extrato hidro-alcoólico utilizou-se a metodologia da extração a frio por maceração. No total foram pesados 500g do triturado seco de *Z. zerumbet* em balança digital (Urano® US20/2 POP-S) distribuídos em cinco frascos Mariott (identificados como Lotes 1, 2, 3, 4 e 5) previamente limpo e seco com 100g de *Z. zerumbet* cada. Com o auxílio de uma proveta, preparou-se a solução extrativa com a adição de 500 mL de água de destilada e 500 mL de álcool 96% (v/v; 1:1) ao material botânico em cada frasco. A mistura ficou em temperatura ambiente (17-19 °C), pelo período de extração estática de 72 horas. Após esse período, o extrativo resultante foi filtrado em papel filtro do tipo coador de café com o auxílio de um funil de vidro e transferido para frasco erlenmayer de 1000 mL (Matos 1980). O filtrado foi então submetido à evaporação e concentração conforme descrito a seguir:

a) Concentração dos extratos

Para o processo de concentração do extrato hidroalcoólico foi utilizado o rotaevaporador a vácuo (TE-211 Tecnal®). O material foi acondicionado em balão de evaporação de fundo redondo com 1/3 imerso em água aquecida a 80 °C (temperatura de ebulição do álcool). O material foi filtrado e rotaevaporado, para a recuperação do solvente e obtenção do extrato hidroalcoólico concentrado em um tempo aproximado de 3h.

Após a evaporação dos solventes o extrativo foi filtrado submetido ao processo de desidratação, congelamento e posteriormente liofilizado e pesados (Matos 1980).

b) Teste de Concentração de volume mg/mL (resíduo seco)

Para análise da concentração mg/mL do extrato hidroalcoólico, após o processo de evaporação do solvente, foram pesados em balança analítica (Bel Engineering®) 10 frascos de vidro e adicionado em cada um deles, com auxílio de pipeta, 1mL do extrato concentrado de *Z. zerumbet* (100g). Posteriormente, os mesmos foram acondicionados em bandeja metálica e levados até a estufa de circulação forçada (Blue M®) onde permaneceram por 72hs, em temperatura constante de 65 °C, após esse período os recipientes foram retirados da estufa e postos em um dessecador por 1h; em seguida extrato seco foi novamente pesado. A massa média dos dez frascos obtida referente à 1mL foi relacionada ao volume total por mL, obtendo-se então concentração de mg/mL (Matos 1980).

c) Liofilização

Após a obtenção do extrativo, o material foi desidratado utilizando-se o processo de liofilização. O processo consiste do congelamento dos extratos frascos com volumes de até 100 mL em freezer convencional por um período de 24h (-18 °C). Após o congelamento o material foi transferido para o liofilizador de bancada (modelo LS300, Terroni®) acoplado em bomba a vácuo (Platinum JB®), acomodados em estante porta-bandeja em câmara de secagem por 4 dias (96 h), a temperatura de -50 °C e pressão (Pa) de 0,0102955. Ao final da desidratação a amostra obtida foi retirada do liofilizador, pesada em balança analítica (Bel Engineering®), o rendimento do extrato hidroalcoólico foi expresso em percentagem (g/100g), em seguida armazenado em frasco de vidro higienizado e seco com tampa e guardado em prateleira de geladeira a temperatura de 4 °C (Matos 1980).

d) Cálculo de rendimento utilizado na produção dos extratos

Para o cálculo de rendimento seguiu-se a recomendação de, pelo método de regra de três simples. Para o extrato hidroalcoólico (m/m; g) utilizou-se a fórmula: $R = (MF \times 100) / MI$ Onde: R - rendimento % ; MF - massa final; MI - massa inicial (Pinheiro 2005).

Técnica de extração do Óleo essencial dos rizomas de *Zingiber zerumbet*

a) Hidrodestilação

Para o processo de extração por hidrodestilação foi utilizado o aparelho de Clevenger modificado acoplado a um balão de fundo redondo com capacidade de 2000 mL, acomodado em manta aquecedora, conectado ao condensador ligado ao refrigerador circulador de água. Foram pesados 250g de material seco em balança digital (Urano US20/2 POP-S) e colocado no balão de fundo redondo, adicionado ao mesmo 2000mL de água. A temperatura regulada em termostato foi de 100 °C e reduzida posteriormente para 80 °C e o tempo de extração foi de 4h contada a partir do início da ebulição. Os volumes foram retirados e medidos diretamente no aparelho de Clevenger graduado, com o cuidado de eliminar o volume da fase aquosa, o rendimento de óleo essencial foi expresso em percentagem (mL/100g). Após processo de hidrodestilação, a amostra de óleo essencial foi centrifugada e seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), para eliminação total

da umidade (Silva *et al.* 1995; Siqueira *et al.* 1986). Os óleos essenciais obtidos foram armazenados em frascos âmbar e acondicionados em geladeira convencional a temperatura de 4 °C.

b) Calculo de rendimento para o óleo essencial

Para o cálculo de rendimento do óleo essencial (v/m; mL) utilizou-se a fórmula:

$R = (VF \times 100) / MI$ Onde: R - rendimento % ; VF - volume final; MI - massa inicial.

Caracterização Fitoquímica

Foram realizadas no Laboratório de Farmacologia e Produtos Naturais, as análises dos compostos orgânicos presentes no extrato hidroalcoólico liofilizado pelo método cromatografia de adsorção em coluna com gradiente de eluição (Matos 1980). Em seguida as frações obtidas foram analisadas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD).

RESULTADOS

Os resultados do rendimento, coloração, pH, percentual de umidade, concentração mg/dl (resíduo seco) e de solubilidade do extrato hidroalcoólico e o rendimento do óleo essencial estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Extrato Hidroalcoólico (EHA) e óleo essencial (O.E) *Z. zerumbet (L.)* Smith.

Rendimento (EHA) (500g)	4,4%
Coloração (EHA)	amarelo-marrom
Ph (EHA)	6,0
Percentual de Umidade (EHA)	20,36%
Concentração mg/ml (Resíduo seco) (EHA)	111,8mg/ml
Teste Solubilidade (EHA)	H ₂ O 3ml/100mg
Rendimento óleo essencial (250g)	3,6 %

Cromatografia de Camada Delgada

Na cromatografia de camada delgada (CCD) o extrato hidroalcoólico apresentou uma mancha azul escura sob luz ultravioleta de 254nm, uma mancha verde escura após ação dos reveladores de Iodo e Sulfato cérico com fator de retenção (R_f) de aproximadamente 0.7, com forte indicação da presença de Zerumbona (Pinheiro 2005).

Com uso de reveladores na CCD, o extrato hidroalcoólico demonstrou teste positivo para presença de terpenóides e flavonóides, o teste não define o teor da concentração final presente no extrato, devido ser uma técnica preliminar (Silva *et al.* 2010).

Tabela 2. Cromatografia de camada delgada do extrato de *Zingiber zerumbet*.

Amostra	Eluente	Revelador	Cor	Rf
Zerumbona (Padrão)	8:2 Acetato clorofórmio	Iodo	Verde escuro	0,8
		Sulfato cérico	Verde escuro	---//---
		UV 254nm	Azul escuro	---//---
EHZZ	8:2 Hexano e Acetato de etila	Iodo	Verde escuro	0,71
		Sulfato cérico	Verde escuro	0,69
		UV 254nm	Azul escuro	0,68

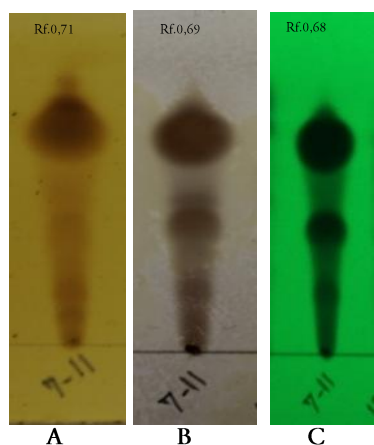


Figura 1. Placas de CCD Reveladas com uso de vapor de Iodo (A), sulfato cérico (B) e UV 254nm (C). Placa de Sílica gel.

CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta resultados da produção do extrato hidroalcoólico obtido a partir dos rizomas de *Z. zerumbet* (L.) Smith e rendimento da extração do óleo essencial. O trabalho de caracterização ainda está em curso, sendo necessária a quantificação do teor de zerumbona a partir de cromatografia em HPLC. Para continuidade do projeto a zerumbona será utilizada como marcador para a preparação das soluções a serem testadas na etapa de reatividade vascular a agentes vasoconstritores e vasodilatadores. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do INPA em 27/08/15 e aprovado em 08/04/16 (Protocolo 030/2015) com previsão de entrega dos animais dia 04/07/16 e início dos experimentos dia 14/07/16. O projeto Universal no qual está inserido este projeto de PIBIC tem prazo de execução previsto até o ano de 2017.

REFERÊNCIAS

- Afzal, M.; Al-hadidi, D.; Menon, M.; Pesek.; Dhama, M.S. Ginger: na ethnomedical, chemical and pharmacological review. *Drug Metabolic Interaction*, 18: 159-190.
- Albuquerque, E.S.B.; Neves, L.J. 2004. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). *Acta Botanica Brasileira*, 18: 109-21.
- Flynn, D.L. 1968. Inhibition of human neutrophil 5-lipoxygenase activity by gingerdione, shogaol, capsaicin and related pungente compounds. *Prostaglandins Leukotrienes Medicine*, 24: 195-198.
- Ghayur, M.N.; Gilani, A.H. 2005. Ginger lowers blood pressure through blockade of voltage-dependent calcium channels. *Journal Pharmacology*, 45: 74-80.

- Grzanna, R. 2004. Ginger extract inhibits beta-amyloid peptide-induced cytokine and chemokine expression in cultured THP-1 monocytes. *Journal Alternative Complement Medicine*, 10: 1009-1013.
- Jolad, S.D. 2004. Fresh organically grown ginger (*Zingiber zerumbet*): composition and effects on LPS-induced PGE₂ production. *Phytochemistry*, 65: 1937-1954.
- Kim, J.K. 2007. [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression in vitro and in vivo. *Free Radic. Res.*, 41: 603-614.
- Matos, F.J.A. 2002. *Farmácias vivas - Sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. Fortaleza: EUFC. 4: 267.
- Matos, F.J.A. 1980. *Introdução a Fitoquímica Experimental*, 3: 129.
- Pinheiro, C.C.S. 2005. Processo de obtenção de zerumbona isolada dos óleos essenciais das raízes de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae). Pedido de depósito nacional de patente PI0505343-9. Data de depósito 28/11/2005.
- Silva, J.S.; Afonso, A.D.L.; Guimarães, A.C. 1995. Estudos dos métodos de secagem. In: Pre-processamento de produtos agrícolas. Juiz de Fora, MG. Instituto Maria. 2: 105-143.
- Silva, N.L.A. da; Miranda, F.A.A.; Conceição, G.M. da. 2010. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, 6: 402.
- Siqueira, N.C.S.; Silva, G.A.A.B.; Alice, C.B. 1986. Análise dos óleos essenciais de algumas plantas aromáticas tradicionais ou nativas no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira Farmacologia*, 67: 118-128.
- Thomson, M. 2002. The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 67: 475-478.
- Vasconcelos, S.M. 2007. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirevisão. *Revista Brasileira Hipertensão*, 14: 269-274.